

人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究

(3). 牡牛精液に於ける Hyaluronidase の分布. 及び

添加 Hyaluronidase 製剤の精子による吸着

和田 宏・湯原 正高

Studies on Hyaluronidase in the Artificial Insemination.

(3) Distribution of Hyaluronidase in the Bull Semen and Absorption of Added Hyaluronidase preparation by Spermatozoa.

Hiroshi WADA and Masataka YUHARA

(1) This studies were carried out to investigate distribution of hyaluronidase in the bull semen and absorbable amount of added hyaluronidase preparation by spermatozoa.

For this experiment, 10 ejaculates were obtained by using the artificial vagina from 3 bulls; one of them was the Japanese Black breed and others were the Holstein breed. Hyaluronidase level was determined by viscosimetry after McClean's technique slightly modified as described in a previous report.

(2) For this purpose, three sorts of determination as described below were performed on the same semen which had been kept at room temperature 5 hours after ejaculation; semen samples were prepared so as to suitable for the determination as follows:

Determination of semen-hyaluronidase: Hyaluronidase level was determined of the semen which was diluted with distilled water and did not receive any other treatments such as homogenization. We refer the enzymatic activity of this semen to the semen-hyaluronidase.

Determination of seminal plasma-hyaluronidase: after centrifugation of semen, seminal plasma was obtained and assayed for its enzymatic activity.

Though this enzyme is considered to have diffused into seminal plasma from spermatozoa and we called it the seminal plasma-hyaluronidase.

Determination of sperm-hyaluronidase: The semen was added to distilled water of 10 cc. and shaken, and after centrifugation of it supernatant fluid was decanted. this washing was repeated 4 times. Finally, 10 cc. of an egg yolk emulsion (distilled water 8.5 cc.: fresh egg yolk 1.5 cc.) was added to the sediment (sperm) and it was homogenized in the homogenizer (fig 1) at 18,000 revolutions per minute for ten minutes. The homogenate prepared by the above method was assayed for hyaluronidase. The enzyme remaining in the spermatozoa so treated was determined and named sperm-hyaluronidase.

(3) The data of these determinations were shown in table 1 and the results calculated from them were presented in table 2.

The level of sperm-hyaluronidase per 100 millions of spermatozoa is greater than the differences between semen-hyaluronidase and seminal plasma-hyaluronidase moreover it is generally greater than the level of semen-hyaluronidase itself.

Accordingly, in the determination of semen-hyaluronidase, a part of sperm hyaluronidase may not take part in enzymatic reaction and this we called tentatively potential (or internal) sperm-hyaluronidase.

The other part of semen-hyaluronidase which takes part in enzymatic reaction in determination of semen-hyaluronidase we called active (or external) sperm-hyaluronidase.

Generally, in the sperm-hyaluronidase at 5 hours after ejaculation, the level of the potential enzyme was about 1.5 times as large as that of the active enzyme.

(4) Hyaluronidase preparation ("Sprase" was used. Sprase is a testicular hyaluronidase preparation of the Mochida Pharmaceutical Mfg. Co., Ltd.,) was added to semen in amount of 60,000 v. r. u. or 120,000 v. r. u. per cc. of semen.

After 5 hours following the addition, sperm-hyaluronidase was assayed for its enzymatic activity.

Comparing with the control, there was little increase of enzymatic activity in the sperm-hyaluronidase by addition of the lower dose, but a little increase was observed by addition of the higher dose.

Speaking of the dose per 100 millions of spermatozoa, the higher the dose the larger absorption of hyaluronidase preparation by spermatozoa result in.

The amount of preparation added which resulted in the absorption of hyaluronidase by spermatozoa seemed to be beyond the harmless level to the motility of bull spermatozoa.

It seems to be difficult to increase the level of sperm-hyaluronidase without decrease in the motility of bull spermatozoa.

牝牛精液に対し均質化などの処理を行わずに、精液の Hyaluronidase〔以下 H-ase とす〕の力価を測定し、之を精液 H-ase (semen-H-ase) と称したことは前報⁽¹⁹⁾の通りである。此の力価を考慮におき精液に対し各種の量の H-ase 製剤を添加し、その場合に於ける精子の生存率や活力に対する影響を観察した結果についてもすでに報告した⁽¹⁸⁾。然しながら精液 H-ase と精漿及び精子自体の H-ase の間の量的関係、即ち精液中に於ける H-ase の分布状態については、これまで触れていなかったので一応これを検討することとした。

また H-ase 製剤の精液への添加、または子宮頸管内への注入により受胎率を増加せしめ得ると云う報告があり、之を肯定するものと否定するものの両論があることは、すでによく知られている。受胎上に於て H-ase 製剤添加の効果を認めるとしても、添加されたる酵素製剤が精子に附着または吸収されて卵子と精子の選合を助けるものであるか、または牝の生殖器の収縮或いは

吸引運動などにより、精漿と共に逕合場所に到達するものであるかについては明らかにされていない。

もし吸着されないならば酵素添加の効果は受精前期即ち精子と卵子の逕合⁽⁰⁾までしか期待することが出来ない。H-ase が細胞質の粘度を低減し細胞分裂を促すことを山根は暗示している。従つて、もしまた添加酵素が精子に吸着されるとするならば、その効果は受精後期即ち受精卵の分裂発展の過程に至るまで期待出来るであらう。

以上の様な見地のもとに本実験を行つたのであるが、それらの結果につきここに報告する。

実験材料及び方法

供試精液は岡山県岡山種畜場繋養の健康なホルスタイン種牡牛2頭及び黒毛和種1頭、計3頭の牡牛から撹乳台、人工陰法により得た10例の精液である。

〔I〕精液中に於ける H-ase の分布に対する実験。

此の実験の爲に同一の精液試料につき精液 H-ase (semen-hyaluronidase), 精漿 H-ase (seminal plasma-hyaluronidase) 及び精子 H-ase (sperm-hyaluronidase) の測定を行つた。

H-ase の測定はすべて第1報に報告した方法、即ち McClean の粘度法を極く僅かに修飾した方法に従つて行つた、そして酵素力価は粘度低減単位 (v. r. u.) で示した。基質である Hyaluronic acid としては人臍帯より抽出した Potassium Hyaluronate を用いた。緩衝液や基質溶液の濃度なども、またこれらと試料の混合割合も前報と同様にした。また、Hyaluronic acid の Factor は持田製薬のそれに一致しており、本実験で得られた粘度低減単位 v. r. u. は持田単位である V. U. M. に一致するものである。

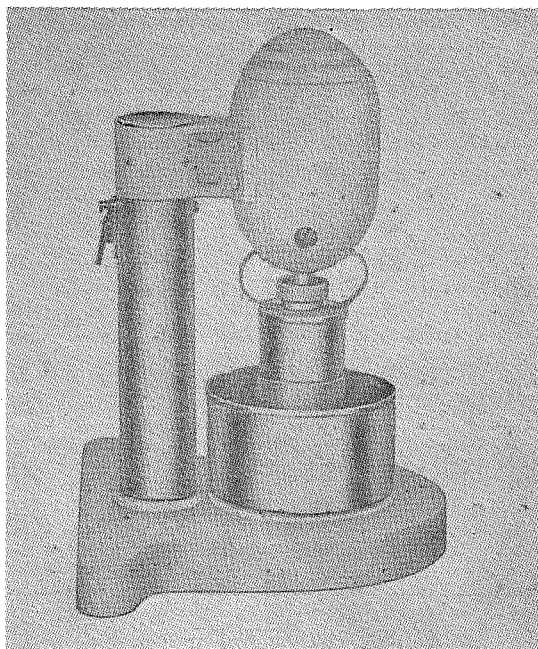
(1). 精液 H-ase の測定： 採取した精液を原液のまま室温に保存し、5時間後に之を蒸留水で適宜稀釈し、それから30分後に Ostwald の粘度計を用い 34°C. の恒温水槽中で測定した。即ち均質化などの処理を加えない無処理の精液の H-ase 力価を測定した。

(2). 精漿 H-ase の測定： 採取後5時間室温に保存した上述の精液の一部を遠心分離にかけて毎分 6,000 回転で10分間分離し精子を完全に沈澱せしめた後、精漿を採り、これを蒸留水で適宜稀釈してその酵素力価を測定した。

(3). 精子 H-ase の測定： 採取後5時間、室温に保存した精液の一定量 (0.2 cc. または 0.5 cc.) に対し蒸留水 10 cc. を加え、これを数回振盪した後、毎分 6,000 回転で10分間遠心分離してその上清を捨て、残つた少量の上清は細長い濾紙の小片で吸い取つた。此の精子の沈澱塊を白金耳

Fig. 1. Homogenizer used in this experiment.

(made by Nihon Seiki Co., Ltd.)



で予め碎き, これに前と同様 10cc. の蒸溜水を加えて再び振盪した後, 遠心分離した. 此の操作を反復して 10cc. 宛の蒸溜水で都合 4 回, 精子を洗滌した.

以上の様にして得られた精子の沈澱塊を 8 cc. の蒸溜水で均質機の容器中に洗い出し, これにさらに 2 cc. の卵黄水 (新鮮卵黄 1.5cc.: 蒸溜水 0.5cc.) を加えた. 従つて略 15% の新鮮卵黄を含む卵黄乳濁液 10 cc. に精子塊を入れたことになる. 此の混合液を毎分 18,000 廻転で 5 分宛 2 回, 都合 10 分間, 均質機 (日本精機製, ホモゲナイザー HA II 型, 第 1 図) にかけた.

また卵黄を添加した理由は筆者の一人, 和田が報じた如く蒸溜水稀釈精液を均質機にかけ高速で均質化するときには H-ase は極く短時間に不活性化して, その力価を失うが, 卵黄その他のコロイドを添加しておくと, これが保護膠質となり, その不活性化を阻止し得ることを知つたが爲である. 精子の破壊により, その H-ase は此の均質物の中に出て来ているわけであり, 之を蒸溜水で適宜稀釈してその酵素力価を測定した. この場合, 卵黄の存在の爲に延びる粘度計内に於ける半減時間の延長は僅かに 1~2 秒であり, 測定及び単位計算上大きな困難を來たさない. かくの如く精子に一定量の卵黄乳濁液を加えたものの均質物につき酵素力価を測定して, これを精子 H-ase と称した.

〔II〕添加 H-ase 製剤の精子による吸着の実験.

採取後, 略 1 時間に, 精液の一定量づつとつて 2 区に分け一方を対照区, 他方を試験区とした. 試験区の精液には, その 1 cc. につき 60,000 V. U. M または 120,000 V. U. M を添加して室温に静置した. H-ase 製剤としては持田製薬の辜丸製 H-ase 製剤である Sprase を用いた. 添加後 5 時間経つてから 前述の精子 H-ase 測定の方法に従い, これを洗滌し卵黄乳濁液の中で均質化して精子の H-ase 力価を測定した. 同じ要領に従つて対照区の精子 H-ase の力価を測定した. 試験区と対照区の精子 H-ase 力価を比較し, 試験区の酵素の増加量をもつて吸着された H-ase の量とみなした. 但し此の場合, 一応吸着と云う言葉を用いたが, 正しい意味に於ける精子への附着か, または精子による吸収が明らかでない.

実験成績及び考察

〔I〕精液中に於ける H-ase の分布.

これに関する実験成績を第 1 表に示した. また, それから計算せられた結果を示せば第 2 表の様になつた.

精液 H-ase は, すでに第 1 報に述べた如く精子 1 億あたり略 10,000 v. r. u. である. 本実験に於ては例数も少なかつたのであるが精子 1 億あたりの精液 H-ase は 8,636 v. r. u. であつた. これに対し精漿 H-ase は精子 1 億あたりにして 3575 v. r. u. であつた. 従つてその差は略 5,000 v. r. u. でこれは精子自体に帰すべき酵素量である. 然し均質化して実際に測定した精子 H-ase の平均値は略 13,500 v. r. u. であつた.

よつて精子 H-ase の中の略 8,000 v. r. u. は精液 H-ase の測定に際し粘度計内に於てい酵素力価を発揮しなかつたものである. 即ち酵素反応に直接関係しなかつたものである. いま仮りにこれを精子 H-ase の中の潜在性酵素 (potential enzyme) または内在性酵素 (internal enzyme) と呼ぶことにするならば前述の精液 H-ase の力価のうち, 精子に帰すべき略 5,000 v. r. u. は活性酵素 (active enzyme) または表在性酵素 (external enzyme) と称することが出来よう.

以上の諸成績から精子 H-ase は精液 H-ase の略 1.5 倍の酵素力価をもっている. そして精子 H-ase のうち, 略 20% 乃至 60% 平均 40% は活性型で存在している. そしてまた略 30% 乃至 80%

Table 1. Distribution of hyaluronidase in the bull semen.

Semen No.	Name of bull	Date on which semen Collected	Semen				Semen-hyaluronidase per cc. of semen v. r. u.	plasma-hyaluronidase per cc. of semen v. r. u.	Sperm-hyaluronidase per cc. of semen v. r. u.
			No. of sperms 100 millions per cc.	pH	percentage of motile sperm (卅)	percentage of live sperm			
1	K. Don	4 Nov. 53	13.7	6.0	92	98	111,470	40,661	200,607
2	K. Gemima	6 Nov. 53	9.7	6.2	63	88	87,209	56,872	169,435
3	K. Don	10 Nov. 53	12.3	5.6	90	94	87,082	44,054	196,261
4	K. Don	16 Nov. 53	11.1	5.8	74	88	102,517	36,296	255,566
5	K. Gemima	18 Nov. 53	11.0	5.6	—	—	115,718	38,913	188,556
6	K. Gemima	9 Nov. 54	9.1	—	46	75	103,015	47,043	117,894
7	Chine	12 Nov. 54	20.2	—	84	94	133,918	43,244	136,363
8	K. Don	16 Nov. 54	12.7	—	78	88	160,413	62,707	132,110
9	Chine	19 Nov. 54	13.7	—	65	80	67,593	32,606	92,836
10	Chine	26 Nov. 53	15.2	—	98	99	105,298	29,084	145,974

Table 2. Sperm-hyaluronidase in the bull semen calculated from the data in table 1.

Semen No.	Semen-hyaluronidase per 100-millions of spermatozoa (A)	Plasma-hyaluronidase per 100-millions of spermatozoa (B)	Sperm-hyaluronidase per 100-millions of spermatozoa (C)	Active sperm-hyaluronidase (A) — (B) (D)	Potential sperm-hyaluronidase (C) — (D) (E)	(E) (D)	(D) (C)
1	8,136	2,967	14,642	5,169	9,473	1.83	0.35
2	8,990	5,863	17,467	3,127	14,340	4.58	0.18
3	7,079	3,581	15,956	3,498	12,458	3.56	0.22
4	9,235	3,269	23,023	5,966	17,057	2.85	0.26
5	10,519	3,537	17,141	6,982	10,159	1.45	0.41
6	11,320	5,169	12,955	6,151	6,804	1.10	0.47
7	6,593	2,140	6,750	4,453	2,297	0.51	0.66
8	12,630	4,937	10,402	7,693	2,709	0.35	0.74
9	4,933	2,380	6,776	2,553	4,223	1.65	0.38
10	6,927	1,913	9,603	5,014	4,589	0.91	0.52
Average	8,636	3,575	13,471	5,061	8,428	1.88	0.42

%平均 60%は潜在酵素として存在している。また活性酵素に対する潜在酵素の比率は0.4倍乃至4.5倍である。要するに精液 H-ase の測定に於いて酵素反応にあづかるのは精子 H-ase のうちの略4割で残余は潜在的に存在していることになる。潜在 H-ase は位置的に精子の内部にあるものか、或いは位置的には精子の外表近くに存在していても酵素的に不活性状態にあるものか明らかでない。精子の中節部にはミトコンドリアに相当する部が存在していると云われているが、H-ase の一部が精子の内部にあるとすれば、おそらく此の様な部にしかも前駆物質の型で存在し

ており, これが均質化などにより破壊露出せられ酵素作用を呈するすのではないかと思われる。

Bergental and Scott⁽²⁾ や高嶺⁽¹³⁾その他の報告により採取後の時間の経過や, 精子の活力の低下に伴い精漿中に於ける H-ase の増量を来たすことが知られている。従つて此の潜在 H-ase が時間の経過やまたは精子の活力の低下と共に精漿中に遊離して来るものと思われる。

いま精液中に於ける全酵素量を H. total として精子1億あたりにつき推算すると次の様になる。

$$H. \text{ total} = H. \text{ semen} + H. \text{ sp. pot.} \quad \text{但し } H. \text{ semen} \text{ は精液 H-ase}$$

$$H. \text{ sp. pot.} \text{ は精子の潜在 H-ase}$$

実験例数が少くて不確実であり且つ夫々の精液で異つてはいるが精液 H-ase と精子の潜在 H-ase の比は略0.9 と云う平均値を得た。この数値は実験例の増加により訂正すべきものと思われるが一応此の数値でもつて計算すると

$$H. \text{ sp. pot.} = H. \text{ semen} \times 0.9$$

$$\therefore H. \text{ total} = H. \text{ semen} \times 1.9$$

従つて精子1億あたりの精液 H-ase を 10,000 v. r. u. とすると精液中の全酵素量は略 19,000 v. r. u. と云うことになる。

〔Ⅱ〕精子による添加 H-ase 製剤の吸収。これに関する実験成績は第3表に示した。

Table 3. Absorption of added hyaluronidase preparation by spermatozoa.

Semen No.	No. of sperms 100millions per cc.	Dose of hyaluro-nidase added per cc. of semen v.r.u./cc.	Dose of hyaluro-nidase added per 100 millions of sperm. v.r.u./cc.	Semen hyaluronidase, v. r. u.				Increased activity of hyaluro-nidase per 100 millions of sperma-tozoa
				original (control)		after addition of hyaluronidase preparation (test)		
				per cc. of semen	per 100 millions of sperm.	per cc. of semen	per 100 millions of sperm.	
1	13.7	60,000	4,370	200,607	14,642	207,221	15,125	483
2	9.7	120,000	12,370	169,435	17,467	207,253	21,366	3,899
3	12.3	60,000	4,870	196,261	15,956	183,767	14,940	-1,016
4	11.1	60,000	5,400	255,566	23,023	255,566	23,023	0
5	11.0	60,000	5,450	183,123	16,647	173,438	15,767	-880
6	9.1	120,000	13,180	117,894	12,955	127,659	14,028	1,073
7	20.2	120,000	5,940	136,363	6,750	150,993	7,474	724
8	12.7	120,000	9,440	132,110	10,402	168,865	13,296	2894
9	13.7	60,000	4,370	92,836	6,776	110,939	8,097	1,321
10	15.2	60,000	3,940	145,974	9,603	143,467	9,438	-165

4例の精液を用い, 夫々その1cc. に対し Sprase を 120,000 v. r. u. 添加したが, この場合精子1億あたりの添加量は 5,940 v. r. u. 乃至 13,186 v. r. u. であつた。

また他の6例の精液に対しては夫々その1cc. につき 60,000 v. r. u. を添加した。この場合添加量は精子1億あたり 3,947 v. r. u. 乃至 5,454 v. r. u. であつた。精子体内に拡散吸収せられたものか, または単なる附着か明らかでないことは前述の通りであるが H-ase 製剤の添加により増加した精子 H-ase をもつて一応精子に吸着されたものとしたが 60,000 v. r. u. の添加では精子 H-ase は殆んど増加しない。120,000 v. r. u. 添加では精子1億あたり平均, 略 2,000

v. r. u. ほど酵素力価が増加している。従つて極く多量の製剤は添加した場合、少量ではあるが、その一部は精子に吸着されたものと思われる。

然しながら第2報⁽¹⁸⁾に報告した如く数万単位以上の Sprase の添加は精子の活力の低下を来す傾向があつた。

また別の観点から受精現象に H-ase が関与するとしても、受精前期、即ち精子が卵子に進入する過程と、受精後期即ち卵核と精核が合一して分裂発生の準備を整える過程に分けて考えるべきであろうと思われる。受精前期に濾胞細胞や放線冠細胞を分散離開させるのみならば精液 H-ase が重要な役割を演ずるであろうが受精後期には精子 H-ase が重要な役割を演ずるものではないか。

精子の活力を減らすことなしに精子 H-ase を増加することが無理なことが判つたのであるから受精後期に関する限り精液に対する H-ase の添加は無意味な様に思われる。

牛の卵管卵子が放線冠細胞で囲まれ精液中の H-ase によつて此の放線冠が離開分散することが事実であると思われる。此の際、精漿 H-ase も之に関与するかも知れないが、精子の活性 H-ase は少くともこれに関与するものと思われる。

併し乍ら H-ase 製剤の添加により活力を正常に保ち且つ精子 H-ase の増加を期待することが出来ないとするならば、精液に対する H-ase 添加の効果は結局、精漿中の H-ase の増加に基づく効果にまつよりほかはないものと思われる。この点については今後さらに検討を進める積りである。

摘 要

(1). 精液中に於ける H-ase の分布及び添加 H-ase 製剤の精子により吸着される量を検討する爲に此の研究を行つた。此の実験の爲に3頭の牡牛(その中1頭は黒毛和種、他の2頭はホルスタイン種)から人工墮法により10例の精液を得た。H-ase の測定は前報に述べたと同様に Mc Clean の方法を僅かに修飾した粘度法によつた。

(2). この目的の爲に採取後5時間、室温に保つた同じ精液試料につき次の様な3種の測定を行つた、そしてそれに適する様に精液を調整した。

精液 H-ase の測定: 均質化や、その他の処理を加えない精液を蒸留水で稀釈して H-ase 量を測定した。此の酵素力価を精液 H-ase によるものとした。

精漿 H-ase の測定: 精液の完全な遠心分離後、精漿を得て、その酵素力価を測定した。此の酵素は精子から精漿中に遊離したものと考えられるが、吾々は之を精漿 H-ase と称した。

精子 H-ase の測定: 精液 0.2cc. または 0.5cc. に蒸留水 10cc. を加え遠心分離後上清を傾斜した。此の洗滌を4回反復した。最後に沈澱(精子塊)に 10cc. の卵黄乳濁液(蒸留水 8.5cc. : 新鮮卵黄 1.5cc.) を加え、それを1分間 18,000 回転のホモゲナイザーで均質化した。上記の如くしてつくられた均質物の H-ase を測定した。精子中に残っている H-ase が測定されたものでこれを精子 H-ase と称した。

(3). これらの測定成績を第1表に示し、それから計算された結果を第2表に示した。

精子一億あたりの精子 H-ase の量は精液 H-ase と精漿 H-ase の差よりも大きく、概して精液 H-ase そのものよりも大きい。

従つて精子 H-ase の一部は精液 H-ase の測定に於いてその酵素反応にあづかつていないことになる。吾々はこれを潜在的(または内在的)精子 H-ase と称した。そして精子 H-ase の中で酵素反応に参加する他の部分を活性(または表在性)精子 H-ase と称した。

一般的に射精後5時間の精液に於いて潜在的酵素の量は活性酵素の量の略1.5倍であつた。

(4). H-ase 製剤 (持田製薬の睾丸性 H-ase 製剤である Sprase を使用した) を精液 1cc に対し 60,000 v. r. u. または 120,000 v. r. u. 添加した。添加後5時間以後に於いて精子 H-ase の酵素力価を測定した。対照区と比較するとき前者の量の添加では精子 H-ase の力価は殆んど増加しないが、後者の量では僅かに増加する。

精子1億に対する用量の点からするならば高い用量では大きな吸収を結果する。

精子による吸収がみられる H-ase 製剤の用量は精子の運動性に対し無害の範囲を超えている様に思われる。精子の運動性を減らすことなしに精子 H-ase の量を増すことは困難と思われる。

本実験を行うにあたり精液の供与その他の御援助を戴いた岡山県岡山種畜場場長辛島忠氏、技官渡辺滋樹氏に深謝の意を表する。

文 献

- 1) 秋谷七郎, 相沢登 (1952); Hyaluronidase に就いて. スプレーゼ文献集, 第一輯, PP. 1~9.
- 2) Bergenstal, D. M. and Scott, W. W. (1948); Studies on hyaluronidase. J. Amer. Med. A., 137 (17), PP. 1507~1511.
- 3) Johnstone, J. E., Ston E. J., and Mixner, J. P. (1949); Hyaluronidase relationships in dairy bull semen. J. Dairy Sci., 32—6, PP. 574~579.
- 4) Johnston, J. E. and Mixner, J. P. (1948); Development of hyaluronidase in bull semen. J. Animal Sci., 7~4, PP. 440~446.
- 5) Johnston, J. E. and Mixner, J. P. (1950); Relationship of hyaluronidase concentration to fertility of dairy bull semen. J. Dairy Sci., 33~11, PP. 847~850.
- 6) Johnston, J. E. and Mixner, J. P. (1951); Effects of added hyaluronidase and hyaluronic acid on the motility of bull spermatozoa. J. Dairy Sci., 34~2, PP. 116~118.
- 7) 加藤浩 (1952); 卵子と精子の特殊物質 (2). 畜産の研究, 6—5, PP. 294~298.
- 8) McClean, D., Hale, C. W. (1941); Studies on diffusing factors the hyaluronidase activity of testicular extracts, bacterial culture filtrats and other agents that increase tissue permeability. Biochem. J. (1, 2), PP. 159~183.
- 9) Pommerenke, W. T. and Ellenmae Virgiver (1947); Comparison of rates of penetration of unwashed and washed spermatozoa in cervical mucus. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., Vol. 66, 161~163.
- 10) 梶山正雄 (1940); 受精生理学. P. 18養賢堂.
- 11) Sallman, B. and Birkeland, J. M. (1950); Interrelationships of spermatozoa count, hyaluronidase titer, and fertilization. Ann. N. Y. Acad. Sci., 52, PP. 118~1191. (Animal breeding abstracts, 19—4, PP. 468~469, 1951)
- 12) 高島達夫 (1951); 精液中の Hyaluronidase に関する研究. 日本産科婦人科学会雑誌, 3—2, P. 69.
- 13) 高嶺浩 (1952); 受精と Hyaluronidase 及びその inhibitor について. スプレーゼ文献集, 第二輯, PP. 69~75.
- 14) 高嶺浩 (1953); 受精に於ける子宮頸管粘液の意義. 畜産の研究, 7—1, PP. 9~12.
- 15) 和田宏 (1954); 牡牛精液ヒアルロニダーゼの実験的不活性化及びその阻止. 岡山大学農学部学術報告, 第4号, PP. 32~42.

- 16) 和田宏, 竹原宏 (1954); 人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究 (2) 添加 Hyaluronidase が牡牛精子の活力に及ぼす効果. 岡山大学農学部学術報告, 第5号, PP. 40~47.
- 17) 和田宏, 竹原宏 (1954); 人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究 (1) 牡牛精液の Hyaluronidase 力価について. 日本畜産学会報, 25巻, 2-4号, PP. 111~117.
- 18) 山根甚信 (1952); 繁殖生理学領域に於ける Hyaluronidase の意義. スプレーゼ文献集, 第二輯, PP. 60~69.
- 19) 安田徳治, 高橋茂孝 (1952); 家畜精液中の全 Hyaluronidase 含有量について. 日本畜産学会報, 23巻, 3号, PP. 99~101.